

**PCT**ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :	C12N 5/10, 15/85 // (C12N 5/10, C12R 1:91)	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/16163</b>
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE95/01699		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Mai 1996 (30.05.96)
(22) Internationales Anmeldedatum:	21. November 1995 (21.11.95)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten:	P 44 41 327.0 22. November 1994 (22.11.94) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).		
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	FRANZ, Wolfgang-Michael [DE/DE]; Neuenheimer Landstrasse 18b, D-69120 Heidelberg (DE). WOBUS, Anna, M. [DE/DE]; Liebigweg 7, D-06466 Gatersleben (DE).		
(74) Anwalt:	BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		

**(54) Title:** EMBRYONAL CARDIAC MUSCLE CELLS, THEIR PREPARATION AND THEIR USE**(54) Bezeichnung:** EMBRYONALE HERZMUSKELZELLEN, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG**(57) Abstract**

The invention concerns embryonal (cardiomyocitary and cardiomyoblastary) cardiac muscle cells, their preparation and their use, in particular for cell-mediated gene transplant. The areas of application of the invention are medicine and genetic engineering. The embryonal cardiac muscle cells according to the invention contain two gene constructs comprising: a) a regulatory, 2.1-kb long DNA sequence of the ventricle-specific myosin light-chain-2 (MLC-2v) promoter, the selectable marker gene  $\beta$ -galactosidase in fusion with the reporter gene neomycin; and b) a regulatory DNA sequence of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter and the selectable marker gene hygromycin. and optionally immortalising genes and/or optionally genes inactivated by homologous recombination and/or optionally one or a plurality of therapeutic genes. The cells can advantageously be used for cell-mediated gene transplant, in particular for constructing healthy tissue and assisting contractile functions, for investigating substances, in particular for pharmacological investigations and for the transfer of therapeutic genes into the myocardium.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft embryonale (kardiomyozytäre und kardiomyoblastäre) Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik. Die embryonalen Herzmuskelzellen gemäß der Erfindung enthalten zwei Genkonstrukte aus a) regulatorischer, 2,1 kb langer DNA-Sequenz des ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2 (MLC-2v) Promotors, dem selektionierbaren Markergen  $\beta$ -Galaktosidase in Fusion mit dem Reportergen Neomycin und aus b) regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors und den selektionierbaren Markergen Hygromycin, sowie ggf. immortalisierende Gene und/oder ggf. durch homologe Rekombination inaktivierte Gene und/oder ggf. ein oder mehrere therapeutische Gene. Sie können vorteilhaft zur zellvermittelten Gentransplantation, insbesondere zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktiler Funktionen, zur Untersuchung von Substanzen, insbesondere für pharmakologische Untersuchungen und für den Transfer therapeutischer Gene in das Myokard eingesetzt werden.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Embryonale Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung**

**Beschreibung**

Die Erfahrung betrifft embryonale (kardiomyozytäre und kardiomyoblastäre) Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation. Anwendungsgebiete der Erfahrung sind die Medizin und die Gentechnik.

Es gibt bereits mehrere Arbeiten, die sich mit Herzmuskelzellkulturen von Säugetieren beschäftigen. Die ersten Untersuchungen wurden mit Primärkulturen von embryonalem, neonatalem oder adultem Herzgewebe durchgeführt. Vorteilhafter ist die Verwendung von permanenten Zelllinien von kardiomyozytärem Gewebe, weil man damit größere Mengen einer homogenen Zellpopulation auf einem definierten Entwicklungsstand zur Verfügung stellen kann. Deshalb hat es eine Reihe von Versuchen zur Immortalisierung von Herzmuskelzellen gegeben (u. a. A. Sen et al, J.Biol.Chem. 263/1988/, 19132-19136). Alle bisherigen Zelllinien haben jedoch den Nachteil, daß sich bei einer Langzeitkultivierung funktionelle Defekte bemerkbar machen.

Die Erfahrung hat das Ziel, ausgehend von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC) oder primordialen Keimzellen (EGC, Stewart et al, Dev. Biol. 161/1994/, 626-628) nach deren Differenzierung in spontan pulsierende Herzzellen embryonale (kardiomyozytäre bzw. kardio-myoblastäre) Herzmuskelzellen zu gewinnen, welche weitgehend identische Eigenschaften mit Herzmuskelgewebe besitzen. Diese Zellen sollen für einen therapeutischen Einsatz, ggf. nach zusätzlicher gentechnischer Veränderung, geeignet sein. Der Erfahrung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Vektorsystem zur Modifizierung der Stammzellen zu konstruieren und ein Selektionsverfahren für die transfizierten Zellen zu entwickeln.

Die Erfindung wird mit modifizierten embryonalen Stammzellen gemäß Anspruch 1 bis 4, den Vektorsystemen gemäß Anspruch 5 und 6 und den Selektionsverfahren gemäß Anspruch 7 realisiert. Zum Schutzmfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der modifizierten embryonalen Stammzellen gemäß Anspruch 8 bis 10.

Die erfindungsgemäßen Vektoren bestehen aus folgenden Bestandteilen:

- a) der regulatorischen, 2,1 kb langen DNA-Sequenz des ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2(MLC-2v) als Promotor, dem selektionierbaren Marker-Gen  $\beta$ -Galaktosidase und dem Reporter-Gen Neomycin als Fusionsgen "Bgeo" und dem SV40-PolyA-Tail(pAA) und ggf. einer Position zur Aufnahme von immortalisierenden Genen.
- b) der regulatorischen DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors(HSV-Tk), dem selektionierbaren Marker-Gen Hygromycin und dem SV40-PolyA-Tail (pAA).

Mit diesen Vektoren werden pluripotente embryonale Stammzellen *in vitro* transfiziert. Die erfolgreich transfizierten Zellen werden im ersten Schritt mit Hilfe von Hygromycin selektiert. Hygromycin-resistente Zellen werden dann zu sog. Embryoidkörpern ("embryoid-bodies") differenziert. Danach erfolgt eine Selektion der Hygromycin-resistenten Embryoidkörper mit dem Zellgift Geneticin (G418). Die erhaltenen Zellen werden weitergezüchtet und auf ihre Zusammensetzung (Genexpression, Proteine), ihre Funktion und ihre kontraktile Eigenschaften untersucht.

Als Ausgangsmaterial können embryonale Stammzellen (ESC) oder primordiale Keimzellen (EGC) unterschiedlichster Herkunft, u. a. von Maus, Ratte, Schwein, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, einschließlich menschlicher Zellen, eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Vektoren und der Ablauf des Zellselektionsverfahrens sind in Abbildung 1 dargestellt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Zellen, die neben den genannten Vektoren a) und b) auch noch therapeutische Gene wie z. B. die Angiogenesefaktoren VEGF oder bFGF enthalten, welche durch viralen oder nichtviralen Gentransfer eingebracht wurden.

Die so erhaltenen Zellen können - mit oder ohne virale Sequenzen - zur zellvermittelten Gentransplantation, insbeson-

der zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktiler Funktionen, verwendet werden.

Eine weitere wichtige Verwendung der erfindungsgemäßen Zelllinien besteht in der in-vitro-Testung von biologisch aktiven Substanzen, insbesondere zur Untersuchung pharmakologisch relevanter Substanzen oder zur Feststellung toxischer Wirkungen exogener Wirkstoffe an Herzzellen in Kultur. Damit werden insbesondere in Screeningprogrammen Tierversuche eingespart und damit dringende Forderungen der Öffentlichkeit nach Tierersatzmodellen erfüllt.

Die Zelllinien können weiterhin als Vesikel für einen lokalen Gentransfer in das Myokard dienen. Dazu werden die gewünschten therapeutischen Gene durch ein virales, bevorzugt mit einem Adenovirus- oder einem Adenovirus-assoziierten-Virus-Shuttle-Vektor, oder ein nichtvirales Gentransferverfahren transfiziert. Bevorzugt erfolgt die Verpackung der Gene mit dem AAV-Vektor pSub201.

Durch die Erfindung wird erstmalig ermöglicht, Herzmuskel-erkrankungen mit Hilfe des zellulären Gentransfers zu behandeln (Gentherapie). Das bedeutet einen erheblichen medizinischen Fortschritt, insbesondere können auch Erkrankungen wie ischämische und kongenitale Kardiomyopathien künftig mit größeren Erfolgsaussichten therapiert werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

#### 1. Klonierung der Vektoren zur Selektion embryonaler (kardiomyozytärer und kardiomyoblastärer) Herzmuskelzellen

Zum Aufbau der Vektoren geht man von folgenden Elementen aus:  
2.1 kb MLC-2v Promotor (klonierbar mit KpnI und EcoRI), Fusionsgen Bgeo (klonierbar mit BamHI), SV40-PolyA (klonierbar mit SacI) und Tk-Hygromycin Fusionsgen im Blueskript KS-Vektor. Wie in Abbildung 1 dargestellt, werden aus diesen Elementen 2 Vektoren für die Ktransfektion in pluripotente embryonale

Stammzellen erstellt:

- (A) 2,1 MLC-2v- $\beta$ geo
- (B) Tk-Hygromycin.

**2. Kotransfektion der Vektoren in pluripotente Stammzellen (ES-Zellen) und Selektion mit Hygromycin B**

Als pluripotente Stammzelllinie kann jede ES-Zelllinie verwendet werden, die in Kardiomyozyten differenziert (Wobus et al, Differentiation 48/1991/, 173-182), z. B. die Linie D3 (Doetschmann et al, J. Embryol. Exp. Morphol. 3/1985/, 27-45). Die D3-Zellen werden auf gelatinisierten Platten mit standardisiertem Kulturmedium auf feeder-layer oder in Anwesenheit des rekombinanten "Leukemia-Inhibiting-Factor" (LIF) kultiviert. Der LIF entspricht dem "Differentiation Inhibiting Factor", welcher die Differenzierung der ES-Zellen verhindert und die Zellteilung der pluripotenten ES-Zellen fördert. Die in Abbildung 1 dargestellten DNA-Konstrukte werden durch Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht. Hierfür werden die Vektoren mittels Restriktionsverdau linearisiert und in einer Konzentration von 25  $\mu$ g/ml mittels Elektroporation transfiziert. Danach werden die pluripotenten ES-Zelllinien im LIF/ES-Zellmedium expandiert. In den undifferenzierten ES-Zellen ist nur der Thymidinkinase-Promotor aktiv, was zu einer Expression des Hygromycin-Resistenzgens führt. Durch Zugabe von Hygromycin B werden die ES-Zellen auf den Einbau der Fremd-DNA hin selektiert (Positiv-Selektion).

**3. Nachweis der Integration von MLC-2v- $\beta$ geo in ES-Zellen und "embryoid-bodies"**

Zur Gewinnung von "embryoid bodies" wird das Differenzierungssystem des hängenden Tropfens benutzt. Hierbei wird eine Zellsuspension, die etwa 400-600 ES-Zellen in 20 l enthält, auf die Deckel von Petrischalen pipettiert, die mit einer physiologischen Pufferlösung gefüllt sind. Die Zellen sammeln sich im Tropfen und bilden nach zwei- bis dreitägiger Inkubation

"embryoid bodies". Nach 7 Tagen werden die "embryoid bodies" auf Mikrotestgewebekulturschalen übertragen, wo sie auf dem Gelatine-beschichteten Substrat anhaften. Während der darauf-folgenden Kultivierung wachsen verschiedene Zelltypen, u. a. Herzmuskelzellen, aus (Abbildung 2). Zwei bis zehn Tage nach Ausplattierung enthalten etwa 80 bis 90% der ausgewachsenen "embryoid bodies" Kolonien spontan und synchron kontrahierender Herzmuskelzellen (Wobus et al, 1991). In diesen embryonalen Herzmuskelzellen ist der MLC-2v Promotor aktiv. Bei erfolgreicher Transfektion und Integration des MLC-2v- $\beta$ geo Vektors in das Genom der ES-Zellen kommt es zur Expression des Fusionsgens  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin. Durch Blaufärbung im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay lassen sich die kardiomyozytären Zellen, welche klonalen Ursprungs sind, identifizieren.

#### 4. Selektion embryonaler kardiomyozytärer und kardioblastärer Zellen

In einem zweiten Schritt werden die positiven ES-Zellklone, welche sowohl das Tk-Hygromycin als auch das MLC-2v- $\beta$ geo Fusionsgen enthalten, erneut expandiert und ein Teil unter den oben beschriebenen Bedingungen zur Differenzierung in "embryoid bodies" gebracht. Zum Zeitpunkt der kardiomyogenen Differenzierung im Embryoidkörper wird das Zellgift Geneticin (G418) in einer Konzentrationen von 300  $\mu$ g/ml zu den "embryoid bodies" gegeben. Damit werden die embryonalen (kardiomyozytären bzw. kardiomyoblastären) Herzmuskelzellen in einem frühen Stadium selektiert.

Die gewonnenen Zellen werden auf gewebespezifische Genexpression, funktionelle Eigenschaften mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken und auf ihre kontraktile Eigenschaften untersucht, die Zusammensetzung der kontraktile Proteine wird mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern charakterisiert. Im Rahmen einer Gentherapie können teilungsfähig schlagende Zellen anschließend auf adulte und neonatal kardiomyopathische "mdx-Mäuse" nach Thorakomie und direkter Injektion in das Myokard übertragen werden.

5a

**Text zu Abbildung 1:**

**(C) Kotransfektion von Tk-Hygromycin und 2.1 MLC-2v-βgeo in ES(EG)-Zellen**

- Selektion der transfizierten ES(EG)-Zellen
- Differenzierung der Hyg-resistenten ES(EG)-Zellen zu "embryoid-bodies"
- Selektion von Herzmuskelzellen aus "embryoid-bodies" mittels G418
- Charakterisierung der Hyg- und G418-resistenten Zellen auf kardiomyozytäre bzw. kardiomyoblastäre Eigenschaften

**Text zu Abbildung 2:**

**Embryonale Stammzellen kultiviert auf "feeder layer"**

**Kultivierung von 400 oder 600 Zellen/20 µl Medium in hängenden Tropfen (Inkubation für 2 Tage)**

↓

**Umsetzung der "embryoid bodies" und Kultivierung in Suspension (Inkubation für 5 Tage)**

↓

**Ausplattieren von "embryoid bodies" auf 24-well Gewebe-Kulturplatten (Inkubation bis zu 20 Tagen)**

↓

1. PCR Analyse
2. Enzymatische Dissoziation der Cardiomyocyten
3. Immunfluoreszens
4. "Patch-clamp" - Versuche

## Patentansprüche

1. Embryonale Herzmuskelzellen, enthaltend zwei Genkonstrukte aus zwei verschiedenen regulatorischen DNA-Sequenzen und zwei verschiedenen selektionierbaren Markergenen.
2. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1, enthaltend zwei Genkonstrukte aus
  - a) regulatorischer, 2,1 kb langer DNA-Sequenz des ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2(MLC-2v) Promotors, dem selektionierbaren Markergen  $\beta$ -Galaktosidase und dem Reporterogen Neomycin,
  - b) regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors und dem selektionierbaren Markergen Hygromycin.
3. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 und 2, enthaltend zusätzlich immortalisierende Gene und/oder durch homologe Rekombination inaktivierte Gene und/oder ein oder mehrere therapeutische Gene.
4. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 bis 3, enthaltend zusätzlich Sequenzen des Adenovirus (Ad) oder des Adenoassoziierten Virus (AAV).
5. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 bis 4, enthaltend zusätzlich einen Angiogenesefaktor, bevorzugt "vascular endothelial growth factor", VEGF, oder "basic fibroblast growth factor", bFGF, unter der Kontrolle eines in diesen Zellen aktiven Promotors als therapeutisches Gen.
6. Vektor, bestehend aus MLC-2 Promotor, selektionierbarem Markergen  $\beta$ -Galactosidase und dem Reporterogen Neomycin als Fusionsgen "Bgeo", SV40-Poly A-Tail und ggf. einer Position zur Aufnahme von immortalisierenden Genen.

7. Vektor, bestehend aus regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thimidinkinase-Promotors und dem selektierbaren Markergen Hygromycin.

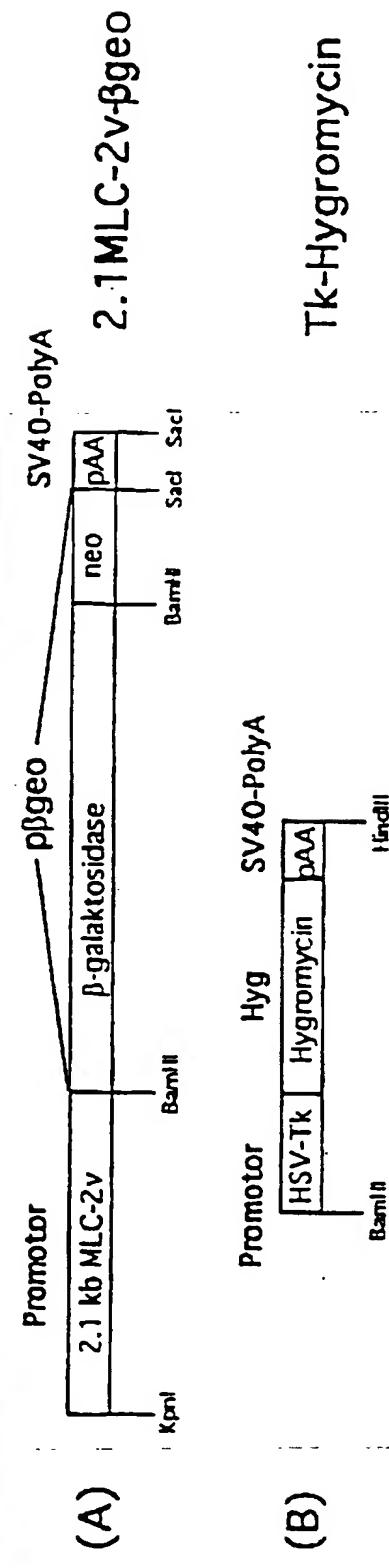
8. Verfahren zur Herstellung von Zellen nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß embryonale Stammzellen (ESC) oder primordiale Keimzellen (EGC) mit den Vektoren nach Anspruch 6 und 7 kotransfiziert werden, die Selektion der embryonalen Stammzellen mit dem Zellgift Hygromycin erfolgt, nach Induktion der in vitro Kardiogenese anschließend die Selektion der embryonalen Herzzellen mit dem Zellgift Geneticin (G418) erfolgt, die erhaltenen Zellen ggf. mit den gewünschten therapeutischen Genen durch ein virales, bevorzugt mit einem Adenovirus- oder einem Adenovirus-assoziierten-Virus-Shuttle-Vektor, oder ein nichtvirales Gen-transferverfahren transfiziert werden.

9. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 4 zur zellvermittelten Gentransplantation, insbesondere zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktiler Funktionen.

10. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 4 zur Untersuchung von Substanzen, insbesondere für pharmakotoxikologische Untersuchungen.

11. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 5 für den Transfer therapeutischer Gene in das Myokard.

**Abbildung 1:**  
**Selektion der embryonalen Herzmuskelzellen**

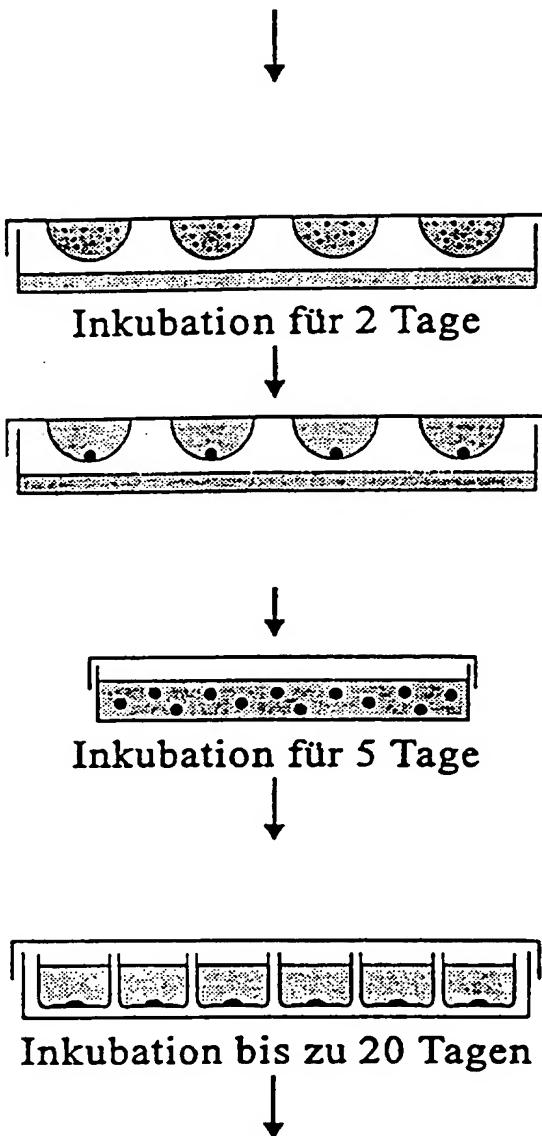


**ERSATZBLATT**

2/2

Abb. 2 :

Embryonale Stammzellen kultiviert auf "feeder layer"

**ERSATZBLATT**

**PCT**  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  <b>C12N 5/10, 15/85 // (C12N 5/10, C12R 1:91)</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/16163</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>30. Mai 1996 (30.05.96)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE95/01699</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>21. November 1995 (21.11.95)</b>			
(30) Prioritätsdaten:  <b>P 44 41 327.0 22. November 1994 (22.11.94) DE</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>18. Juli 1996 (18.07.96)</b>	
(72) Erfinder; und  (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): FRANZ, Wolfgang-Michael [DE/DE]; Neuenheimer Landstrasse 18b, D-69120 Heidelberg (DE). WOBUS, Anna, M. [DE/DE]; Liebigweg 7, D-06466 Gatersleben (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			

(54) Title: **EMBRYONAL CARDIAC MUSCLE CELLS, THEIR PREPARATION AND THEIR USE**

(54) Bezeichnung: **EMBRYONALE HERZMUSKELZELLEN, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG**

(57) Abstract

The invention concerns embryonal (cardiomyocitary and cardiomyoblastary) cardiac muscle cells, their preparation and their use, in particular for cell-mediated gene transplant. The areas of application of the invention are medicine and genetic engineering. The embryonal cardiac muscle cells according to the invention contain two gene constructs comprising: a) a regulatory, 2.1-kb long DNA sequence of the ventricle-specific myosin light-chain-2 (MLC-2v) promoter, the selectable marker gene  $\beta$ -galactosidase in fusion with the reporter gene neomycin; and b) a regulatory DNA sequence of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter and the selectable marker gene hygromycin. and optionally immortalising genes and/or optionally genes inactivated by homologous recombination and/or optionally one or a plurality of therapeutic genes. The cells can advantageously be used for cell-mediated gene transplant, in particular for constructing healthy tissue and assisting contractile functions, for investigating substances, in particular for pharmacological investigations and for the transfer of therapeutic genes into the myocardium.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft embryonale (kardiomyozytäre und kardiomyoblastäre) Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik. Die embryonalen Herzmuskelzellen gemäß der Erfindung enthalten zwei Genkonstrukte aus a) regulatorischer, 2,1 kb langer DNA-Sequenz des ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2 (MLC-2v) Promotors, dem selektionierbaren Markergen  $\beta$ -Galaktosidase in Fusion mit dem Reportergen Neomycin und aus b) regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors und den selektionierbaren Markergen Hygromycin, sowie ggf. immortalisierende Gene und/oder ggf. durch homologe Rekombination inaktivierte Gene und/oder ggf. ein oder mehrere therapeutische Gene. Sie können vorteilhaft zur zellvermittelten Gentransplantation, insbesondere zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktiler Funktionen, zur Untersuchung von Substanzen, insbesondere für pharmakologische Untersuchungen und für den Transfer therapeutischer Gene in das Myokard eingesetzt werden.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01699A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N5/10 C12N15/85 // (C12N5/10, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CIRCULATION, 92 (8 SUPPL.). 1995. I114., XP002001047 WOBUS A M ET AL: "Retinoic acid induces expression of the ventricular 2.1 kb myosin-light-chain-2 promoter during in vitro cardiogenesis of embryonic stem cells" siehe Zusammenfassung 0536 ---	1-6,8-11
X	J MOL CELL CARDIOL, FEB 1993, 25 (2) P197-213, ENGLAND, XP000568169 ENGELMANN GL ET AL: "Formation of fetal rat cardiac cell clones by retroviral transformation: retention of select myocyte characteristics." see page 198, right-hand column --- -/-	1

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

3

Date of the actual completion of the international search  22 April 1996	Date of mailing of the international search report  10.05.96
--	--

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01699

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 12233 (UNIV NORTH CAROLINA) 24 June 1993 see figure 2 ---	7
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 39, 1995, MD US, pages 23173-23178, XP002001049 HUNTER J. ET AL.: "Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice" see page 23174, left-hand column ---	1,6
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 22, 1992, MD US, pages 15875-15885, XP002001050 LEE K.J. ET AL.: "Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene" see page 15876, right-hand column ---	6
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 7, no. 2, 1987, WASHINGTON US, pages 725-737, XP002001051 DE WET J.R. ET AL.: "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells" see figure 5 -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 95/01699

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 9, 11  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although Claims 9 and 11 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01699

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9312233	24-06-93	US-A- 5275942	04-01-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01699

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N5/10 C12N15/85 // (C12N5/10, C12R1:91)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	CIRCULATION, 92 (8 SUPPL.), 1995. I114., XP002001047 WOBUS A M ET AL: "Retinoic acid induces expression of the ventricular 2.1 kb myosin-light-chain-2 promoter during in vitro cardiogenesis of embryonic stem cells" siehe Zusammenfassung 0536 ---	1-6,8-11
X	J MOL CELL CARDIOL, FEB 1993, 25 (2) P197-213, ENGLAND, XP000568169 ENGELMANN GL ET AL: "Formation of fetal rat cardiac cell clones by retroviral transformation: retention of select myocyte characteristics." siehe Seite 198, rechte Spalte --- -/-	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann habeliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22. April 1996

10. 05. 96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01699

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 12233 (UNIV NORTH CAROLINA) 24.Juni 1993 siehe Abbildung 2 ---	7
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 270, Nr. 39, 1995, MD US, Seiten 23173-23178, XP002001049 HUNTER J. ET AL.: "Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice" siehe Seite 23174, linke Spalte ---	1,6
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 267, Nr. 22, 1992, MD US, Seiten 15875-15885, XP002001050 LEE K.J. ET AL.: "Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene" siehe Seite 15876, rechte Spalte ---	6
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 7, Nr. 2, 1987, WASHINGTON US, Seiten 725-737, XP002001051 DE WET J.R. ET AL.: "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells" siehe Abbildung 5 -----	

3

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. 9, 11

weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

**Bemerkung:** Obwohl die Ansprüche 9 und 11 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

2.  Ansprüche Nr.

weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3.  Ansprüche Nr.

weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs:

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01699

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9312233	24-06-93	US-A- 5275942	04-01-94

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)